

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591429

研究課題名(和文)胎児造血幹細胞移植治療に関する基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for hematopoietic stem cell transplantation before birth

研究代表者

花園 豊 (Hanazono, Yutaka)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：伴性劣性重症複合型免疫不全症(X-SCID)に対する胎児造血幹細胞移植が欧米で実施され成功を収めている。しかし、X-SCIDと異なり移植細胞に増殖優位性のない他の疾患では、移植後の生着効率が低く、十分な治療効果が得られない。この問題に対し、本研究では、ヒツジ子宮内移植系を用いて、移植後の造血細胞の生着効率を向上できないか検討を行った。その結果、(1)ブスルファン投与による移植前処置、(2)移植細胞におけるHoxB4遺伝子の一過性強制発現、(3)サイトカイン投与による移植後処置によって、移植後の造血細胞の生着効率の向上を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：X-linked severe combined immunodeficiency has been successfully treated in US and European countries by in utero transplantation (IUT) of hematopoietic stem cells; however, the engraftment efficiency has not necessarily been high enough for other diseases in which graft cells do not have growth advantage. From a series of experiments in the setting of sheep IUT, we have shown that the engraftment efficiency can be improved by the following methods: (1) Pre-conditioning of fetuses with busulfan, (2) transient forced expression of the HoxB4 gene in donor hematopoietic stem cells, and (3) post-conditioning with cytokines.

研究分野：再生医学、血液学

キーワード：造血幹細胞移植 出生前治療 先天性免疫不全症 大型動物 ヒツジ 子宮内移植

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植が第一選択の根治的治療法になる先天性疾患は数多く存在する。しかし、

・HLA 一致ドナーが得られない場合が少なくない。

・副作用の強い前処置(骨髄廃絶)や免疫抑制が必要になる。

・移植後に無菌管理が必要な上、GVHD や感染症等の合併症に悩まされる。

・生後では既に非可逆的な症状(知能・運動障害など)が出現している場合がある。

・高額な治療費

といった、さまざまなむずかしい問題を抱えている。

出生前の胎児に対する造血幹細胞移植は、これらの問題を一気に解決できる可能性をもつ(表1)。しかも、もし移植後、あいに十分な治療効果が得られなかった場合でも、生後の従来治療の妨げにならない。

欧米では、ヒトで伴性劣性重症複合型免疫不全症(X-SCID)に対する胎児造血幹細胞移植が行われ、見事な成功を収めた(Flake AW et al. N Engl J Med 1996; 335: 1806-1810. Wengler GS et al. Lancet 1996; 348: 1484-1487)。X-SCIDは、IL2受容体 鎖遺伝子を欠損する遺伝疾患で、2歳までに骨髄移植をしないとほぼ全例死亡し、骨髄移植をすれば約半数の患者が生存する。しかし、ドナーが見つ

からないことが少なくない。出生前の造血幹細胞移植治療では、必ずしもHLAを合致させる必要はなく、父親または母親をドナーとするハプロ一致移植でも十分な治療効果が得られている。しかし、我が国ではまだ一例の実施もなく、この治療の実現に向けて研究を推進する必要がある。

X-SCIDの造血幹細胞移植治療では、ドナー由来の正常の造血幹細胞が患者の造血幹細胞に比べて強い増殖優位性をもち、正常の造血幹細胞がわずかでも患者に生着すれば、それが優位に増殖するため、容易に治療効果が得られる。一方、慢性肉芽腫症やサラセミアのように移植細胞に増殖優位性のない場合は、移植細胞が治療レベルまで増えてくれないのが問題である(Muench MO et al. Bone Marrow Transplant 2001; 27: 355-364. Hayward A et al. Fetal Diagn Ther 1998; 13: 8-14)。出生前の造血幹細胞移植治療の本格的な普及に向けて、この問題の解決を図る必要がある。

2. 研究の目的

X-SCIDに対する胎児造血幹細胞移植が成功を収めたものの、X-SCIDと異なり移植細胞に増殖優位性のないような他の疾患では、移植後の生着効率(ドナー由来造血キメラ率)が低く、十分な治療効果が得られない。この問題に対し、本研究では大型動物(主にヒツジ)の子宮内移植系(胎仔への移植系)を用いて、移植後の造血細

表1 胎児造血幹細胞移植の特徴とメリット

特徴	メリット
1. レシピエントの免疫系が未成立	HLA不一致でも移植可。両親をドナーにできる。免疫抑制不要。免疫寛容を利用して生後の追加移植可。
2. 胎児は速やかに生長する	自然な生着スペースの創出があるので、骨髄破壊の前処置が不要。
3. 子宮内は無菌環境	移植後の無菌管理が不要。治療費の大幅な削減。
4. 臨床症状がまだ出現前	非可逆的障害(知能・運動障害)や合併症を回避。
5. 発達途上	移植細胞の増殖・分化を適切に促す微小環境が利用可能。

胞の生着効率を向上できないか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒツジ子宮内移植

妊娠ヒツジを用意した(ジャパンラムから購入)。移植するヒト臍帯血 CD34 細胞を用意した(理研バイオリソースセンターから購入)。超音波ガイド下で妊娠 50~70 日(満期 147 日)のヒツジ胎仔に造血幹細胞を注入した。自然分娩または満期帝王切開によって胎仔を娩出した。実施にあたっては、宇都宮大学農学部附属農場・長尾慶和教授の協力を得た。

(2) 倫理面の配慮

(a) ヒト臍帯血細胞の利用:本研究で使用のヒト CD34 細胞は、ヒト臍帯血由来のものを用いた。ヒト臍帯血は理研バイオリソースセンターから既に購入したが、その利用は以下の通り機関内承認が得られている。

・花園豊申請「造血幹細胞移植治療の効率化をめざす研究」平成 23 年 12 月 27 日承認(臨 11-11 号)

(b) 組換え DNA 実験:本研究で実施された組換え DNA 実験は、以下の通り機関内承認が得られている。

・花園豊申請「幹細胞を利用する再生医療の基盤技術の開発」平成 23 年 9 月 5 日承認(第 14-16 号)

(c) 動物実験倫理:動物を用いる実験プロトコールは各年度ごとに機関内申請し承認を受けた。最新のものは以下の通り。

・花園豊申請「ヒツジを用いる幹細胞研究」平成 27 年 3 月 27 日承認(第 15022 号)

4. 研究成果

我々は、ヒツジ胎仔にヒト造血幹細胞を移植することによって、ヒトの造血をヒツジ体内で再構築

する実験を行ってきた。ヒツジを用いるのは、移植後の流産が少なく、胎仔サイズがヒトに近く、マウス実験より観察期間を長く設定できるからである。

本研究では、(1)移植前処置、(2)グラフトへの処置、(3)移植後の処置を工夫することによって、移植後の造血細胞の生着を改善できるかどうか、検討を行った。その結果は以下に示す通りである。

(1)移植前処置:成人の骨髄移植で行われている移植前処置を、ヒツジ子宮内移植系に応用した。すなわち、化学療法剤ブスルファンを移植前のヒツジ胎仔に投与し、ヒツジ体内におけるヒト造血細胞の生着スペースの拡張を試みた。その結果、ヒツジ骨髄内のヒト造血細胞の比率、ならびに造血キメラヒツジの出現率を有意に向上させることができた。

(2)グラフトへの処置:造血幹細胞の自己複製遺伝子 HoxB4 をヒト造血幹細胞(CD34 細胞)に強制発現させることで、グラフトの増殖力の強化を試みた。すなわち、センダイウイルスベクター(ディナベック)によって HoxB4 遺伝子をヒト CD34 細胞に一過性強制発現させ、ヒツジ胎仔に移植した結果、ヒツジ骨髄内でのヒト造血細胞の比率を約 5 倍に上昇させることができた。

(3)移植後処置:霊長類(ヒトやサル)の造血細胞に増殖効果を及ぼすがヒツジに交叉しないヒト幹細胞因子(SCF)を、サル造血細胞を生着したヒツジに投与することで、ヒツジ体内におけるサル造血細胞の選択的増幅を試みた。その結果、ヒツジ骨髄中のサル造血細胞の比率を最大で約 12 倍に上昇させることができた。

上述の(1)~(3)の3つの方法は、いずれも異なる作用機序を有するため、組み合わせるといけば相乗効果が期待できる。

胎児造血幹細胞移植の適応になるのは、骨髄

表 2 胎児造血幹細胞移植の対象疾患

1. 造血幹細胞移植 単独で治療可能	移植細胞が強い増殖優位性をもつ疾患 X-SCID、ZAP70 欠損症、Jak3 欠損症、 Bloom 症候群、 Wiscott-Aldrich 症候群、Fanconi 貧血 (分類 2?)
2. 前/後処置が 必要	移植細胞の増殖優位性が弱い場合 ADA 欠損症、サラセミア、鎌状赤血球貧血症、慢性肉 芽腫症、白質ディストロフィー (X-ALD)、ムコ多糖症

移植が適応になる疾患全てである。既に欧米で良好な成績が得られている X-SCID が最初の臨床応用の対象疾患になると思われるが、その後は我々が開発した「前処置」や「後処置」が必要になるような、もう少し難度の高い疾患を対象疾患として検討することになる(表 2)。

なお、本研究では、大型動物の子宮内移植系としてヒツジを用いているが、今後、実験用ミニブタでも同様の実験が出来るように準備を進める。

<引用文献> なし

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Abe, T., **Hanazono, Y.**, Nagao, Y.: A long-term follow-up study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. *Exp Anim* 2014;63(4):475-481.
2. Abe, T., Masuda, S., Tanaka, Y., Nitta, S., Kitano, Y., Hayashi, S., **Hanazono, Y.**, Nagao, Y.: Maternal administration of busulfan before in utero transplantation of human hematopoietic stem cells enhances engraftments in sheep. *Exp Hematol* 2012 Jun; 40(6): 436-444.

[学会発表](計 18 件)

1. 阿部朋行, 長尾慶和, 原明日香, スブド・ピャンバー, 柳瀬公秀, ポラジギン・サラントラガ,

緒方和子, 山口美緒, 福森理加, **花園豊**: ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着促進・増幅技術の開発. 第 17 回日本異種移植研究会, 栃木, 2015 年 3 月 14 日.

2. 阿部朋行, 長尾慶和, 柳瀬公秀, 原明日香, ポラジギン・サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, **花園豊**: ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発. 第 61 回日本実験動物学会総会, 札幌, 2014 年 5 月 15-17 日. (抄録集 p. 153)
3. 阿部朋行, 長尾慶和, 柳瀬公秀, サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, **花園豊**: ヒツジ子宮内移植系によるヒト造血幹細胞の定量評価の試み. 第 36 回 日本造血細胞移植学会, 沖縄, 2014 年 3 月 7-9 日. (抄録集 p. --)
4. **花園豊**: 幹細胞治療研究における医学と獣医学の連携. 平成 25 年度獣医学術学会年次大会, 幕張, 2014 年 2 月 21-23 日. (講演要旨集 p. 194-195)
5. 長尾慶和, 阿部朋行, 柳瀬公秀, ポラジギン・サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, 林聡, **花園豊**: ヒツジ子宮内異種移植(I): 生着条件の検討. 第 16 回日本異種移植研究会, 大阪, 2013 年 11 月 10 日. (抄録集 p.41)
6. 阿部朋行, 長尾慶和, 柳瀬公秀, ポラジギン・サラントラガ, 緒方和子, 山口美緒, 林聡, **花園豊**: ヒツジ子宮内異種移植(II): 長期間の造血再構築. 第 16 回日本異種移植研究会, 大阪, 2013 年 11 月 10 日. (抄録集 p.42)

7. Abe, T., Masuda, S., Sarentonglaga, B., Ogata, K., Yamaguchi, M., Hayashi, S., Nagao, Y., **Hanazono, Y.**: Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. 12th Congress of International Xenotransplantation Association, Osaka, November 10–13, 2013. (abstracts p.18)
8. Nagao, Y., Abe, T., Tanaka, Y., Sasaki, K., Masuda, S., Sarentonglaga, B., Ogata, K., Yamaguchi, M., Hayashi, S., Kitano, Y., **Hanazono, Y.**: Factors influencing engraftment of monkey embryonic stem cells in sheep after xenogeneic in utero transplantation. Oral presentation. 12th Congress of the International Xenotransplantation Association, Osaka, November 10–13, 2013. (abstracts p.38)
9. **花園豊**: 再生医学研究: 臨床応用をめざして. 第 77 回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 大宮, 2013 年 9 月 21-22 日. (抄録集 p.53)
10. 阿部朋行, **花園豊**: ヒト化ヒツジの作製を目指して. 第 60 回日本実験動物学会総会ワークショップ, つくば市, 2013 年 5 月 17 日. (講演要旨集 p.133)
11. **花園豊**: 血液再生: マウスからヒトへ. 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013 年 3 月 21-23 日. (抄録集 p.120)
12. 新田卓, 阿部朋行, 田中裕次郎, 佐々木京子, 増田茂夫, ボラジギン・サラントラガ, 林聡, 北野良博, **花園豊**, 長尾慶和: ヒツジ胎子内におけるサル ES 細胞の生着, 造血系分化およびテラトーマ形成に及ぼす要因. 第 105 回日本繁殖生物学会, 筑波, 2012 年 9 月 5-8 日. (Journal of Reproduction and Development, vol.58 suppl., j92, 2012)
13. **Hanazono, Y.**, Abe, T., Nitta, S., Masuda, S., Hayashi, S., Nagao, Y.: Long-term follow-up on the engraftment of human HSCs in sheep after in utero transplantation. ISEH–Society for Hematology and Stem Cells 41st Annual Scientific Meeting, Amsterdam, Netherland, August 23-26, 2012. (Exp. Hematol., Vol. 40 Supplement 1: 158, 2012)
14. Nagao, Y., Abe, T., Tanaka, Y., Sasaki, K., Masuda, S., Nitta, S., Sarentonglaga, B., Hayashi, S., Kitano, Y., **Hanazono, Y.**: Possible factors for engraftment of monkey embryonic stem cells after in utero transplantation into sheep fetuses. 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 29 July to 2 Aug, 2012. (Reproduction in Domestic Animals, Vol. 47, Supplement 4: 589, 2012)
15. Abe, T., Nitta, S., Masuda, S., Hayashi, S., Nagao, Y., **Hanazono, Y.**: HoxB4-transduction of human HSC results in long-term engraftment compared to busulfan-conditioning in sheep after in utero transplantation. The 18th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Kumamoto, June 28-30, 2012. (abstracts p. 148)
16. Abe, T., Nitta, S., Masuda, S., Hayashi, S., Nagao, Y., **Hanazono, Y.**: Long-term comparative study on the engraftment of human hematopoietic stem cells in sheep. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, June 13-16, 2012. (abstracts vol. 1, p. 95)
17. Abe, T., Nitta, S., Masuda, S., Hayashi, S., Nagao, Y., **Hanazono, Y.**: HoxB4-transduction of human HSC results in

longer-term engraftment compared to busulfan-conditioning in sheep after in utero transplantation. 第10回 幹細胞シンポジウム, 兵庫・淡路島, 2012年5月31日~6月2日. (抄録集 p.35)

18. 阿部朋行, 新田卓, 増田茂夫, 林聡, 長尾慶和, **花園豊**: ヒツジにおけるヒト造血細胞長期生着の条件検討. 日本実験動物科学・技術九州2012, 別府, 2012年5月24-26日. (講演要旨集 p. 166)

[図書] なし

[産業財産権] なし

[その他] とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花園 豊 (HANAZONO Yutaka)

自治医科大学・医学部

分子病態治療研究センター

教授 研究者番号: 70251246

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

長尾慶和 (NAGAO Yosikazu)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号: 70291953

阿部 朋行 (ABE Tomoyuki)

自治医科大学・医学部

分子病態治療研究センター

助教 研究者番号: 20610364